

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-145067

(43) 公開日 平成7年(1995)6月6日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/80	A D A A	8217-4 C		
	A B E Z	8217-4 C		
7/00	K			
	D			
	H			
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 11 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平6-133436	(71) 出願人	594100698 ラボラトワレ・ドクター・エヌ・ジェ・パ ヨ フランス・75001・パリ・リュ・ドゥ・カ スティリオン・10
(22) 出願日	平成6年(1994)6月15日	(72) 発明者	アンドレージャン・プリン フランス・78290・クロワッシー・シュエ ル・サン・リュ・デ・ポント・21
(31) 優先権主張番号	9 3 0 7 2 0 5	(72) 発明者	ネイディーン・グーテラル・ドゥ・ヴァ ンサンズ フランス・95270・ショウモンテ・リュ・ デ・フィリュージェ・9
(32) 優先日	1993年6月15日	(74) 代理人	弁理士 志賀 正武 (外2名)
(33) 優先権主張国	フランス (F R)		

(54) 【発明の名称】 外用薬として使用するアンチ・フリーラジカルを使用した化粧品または医薬品の組成物

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、同様に、クロレラ、セネデスム及びスピルリナなどの藻類のヒドログリコール・エキスと生コーヒー豆のエキスとの会合を利用して、皮膚または毛髪の治療のための化粧品または医薬品の組成物を調製することを目的としている。

【構成】 本発明は、少なくともクロレラ、セネデスムス及びスピルリナなどの藻類のヒドログリコール・エキスと生コーヒー豆エキスを有効量含むことを特徴とする、外用薬として使用する化粧品または医薬品の組成物に関するものである。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくともクロレラ、セネデスムス及びスピルリナなどの藻類のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆エキスの有効量を含むことを特徴とする、外用薬として使用する化粧品または医薬品の組成物。

【請求項2】 生コーヒー豆エキスに対する藻類エキスの重量比が1/1から30/1、できれば、2/1から20/1で、さらに、3/1から15/1であればなおさら好ましいことを特徴とする、請求項1に記載の化粧品または医薬品の組成物。

【請求項3】 生コーヒー豆エキスが重量比で0.01から8%、できれば、0.02から5%、さらに、0.05から5%であればなおさら好ましいことを特徴とする、請求項1と2のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項4】 藻類エキ스가重量比で0.1から15%、できれば、0.2から12%、さらに、0.5から8%であればなおさら好ましいことを特徴とする、請求項1から3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】 クロレラ、セネデスムス及びスピルリナなどの藻類のそれぞれを少なくとも5%、できれば10%含む混合物のハイドログリコール抽出から藻類のエキスが得られることを特徴とする、請求項1から4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】 生コーヒー豆エキスの乾燥質に対するカフェイン酸の濃度が40%より上、できれば45%より上、さらに、50%より上であればなおさら好ましいことを特徴とする、請求項1から5のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項7】 0.01から6%の重量比のトコフェロール、できれば、トコフェロール・リノール酸塩を含んでいることを特徴とする、請求項1から6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項8】 0.001%から0.1%の錯化体、できれば、ナトリウムEDTAを含んでいることを特徴とする、請求項1から7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項9】 ローション、乳剤、乳液、極微球、極微粒、クリーム、ゲル、香料・アエロゾル・スプレー、リボゾーム、或いはイオン／非イオン・タイプの小水泡などの形状をしていることを特徴とする、請求項1から8のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項10】 皮膚や毛髪の治療及び抗炎症治療のための化粧品または医薬品の組成物の調製を目的とした、クロレラ、セネデスムス及びスピルリナなどの藻類のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆エキスの会合の使用法。

【請求項11】 クロレラ、セネデスムス及びスピルリナなどの藻類の有効量のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆エキスとの会合を皮膚や毛髪に適用することを特徴とする、皮膚や毛髪の化粧品による手入れ方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、クロレラ、セネデスムス(scenedesmus)及びスピルリナなどの藻類のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆のエキスとの会合から構成された、外用薬として使用することができる化粧品または医薬品の組成物に関するものである。本発明は、同様に、クロレラ、セネデスムス及びスピルリナなどの藻類のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆のエキスとの会合を利用して、皮膚または毛髪治療のための化粧品または医薬品の組成物を調製することを目的としている。

## 【0002】

【従来の技術】本発明は、皮膚と毛髪の化粧品による治療プロセスに関するものである。皮膚と毛髪は、様々な酸化剤から頻繁な攻撃を受け、酸化剤は、その直接的または間接的作用によって、皮膚の急速な老化などの、好ましくなく、しかも有害な影響を及ぼすものである。

【0003】フリーラジカル-短寿命の化学種-が皮膚を含む生物体内で引き起こす有害な影響は、医学や皮膚科学や化粧品に関連する文献に数多く記述されている。フリーラジカルは、酸素と紫外線のあるところで発生し、取分け、ポリ不飽和性脂肪酸-細胞構造の基本的エレメント-と反応して、表皮をひどく変質させることがある。被膜の基本的構成要素である糖脂質、スフィンゴ糖脂質及びリン脂質は、事実、ラジカル作用を生じることのある多数のポリ不飽和性脂肪酸を含有している。このため、過酸化化の中心部が増殖して、顆粒層と皮膚障壁(barriere cutanee)が不安定になる。

【0004】同様に、皮膚と毛髪は、太陽光線や、大気中に含まれる二酸化硫黄、二酸化窒素、炭化水素、ハロゲン化誘導体、炭酸ガスなどから有害な作用を受けることがある。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】このため、皮膚や毛髪を上述のような有害な作用に対して効果的に保護することができる組成物が求められており、現在のところ、フリーラジカルに対して申し分のない作用を備えた医薬品または化粧品の組成物が特に求められている。

【0006】さて、特許を申請する当社は、クロレラ、セネデスムス及びスピルリナなどの極小藻類のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆のエキスとの会合が驚くべきことにラジカル作用に対する表皮の保護だけでなく、フリーラジカルの発生に対しても極めて効き目が強く有効であることを発見した。驚くべきことに、この会合には、極めて重要な抗炎症作用があることも確認された。

【0007】従って、本発明による医薬品及び化粧品の組成物は、少なくともクロレラ、セネデスムス及びスピ

ルリナなどの藻類のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆のエキスを有効量含んでいることを特徴とする。

【0008】クロレラ、セネデスムス及びスピルリナなどの藻類のハイドログリコール・エキスは、ハイドログリコール環境内におけるスピルリナ、クロレラ及びセネデスムスなどの極小藻類成分の抽出プロセスから得られる。

【0009】スピルリナは、ラン藻類に属する。これは淡水藻類だが、品質組成は海水藻類とほとんど変わらない。但し、量的組成については大きな差異がある。例えば、糖質の比率は海水藻類の60%に対して18%、脂質の比率は高く、8%（海水藻類は5%）、不飽和性必須脂肪酸は6.5%（ガンマ＝リノレン酸の比率が大きい）、不飽和化合物は1.5%である。含窒素有機物の比率についても大きな差異があり、海水藻類の10%に対して65%から70%である。このため、この藻類は、必須アミノ酸の極めて豊かな天然資源となっており、必須アミノ酸の比率は極めて高い。要するに、ビタミン、取分け、ビタミンB12、プロビタミンA、ビタミンEが極めて豊富な、利用価値の高い藻類である。

【0010】クロレラは、緑藻類に属する。世界中の湖や池に繁茂している緑色の藻類で、クロロフィルの比率が極めて高く、スピルリナの約10倍もある。

【0011】セネデスムスは、クロレラと同じ類に属する。これも、淡水藻類である。

【0012】クロレラとセネデスムスは、水溶性ビタミンB1、B2及びPPを豊富に備えているという長所がある。スピルリナ、クロレラ及びセネデスムスの3種類の藻類を選定することにより、驚くべきことに、フリーラジカルに対する有効な作用と化粧品研究に利用価値の高いその他の特性を備えたエキスを抽出することができる。

【0013】本発明に準拠して使用する藻類エキスは、水／グリコールの比率が5/95から95/5、できれば、10/90から90/10のハイドロアルコール環境内での抽出プロセスによって抽出するのが好ましい。望ましいグリコールは、グリセリンとグルコール・プロピレンである。

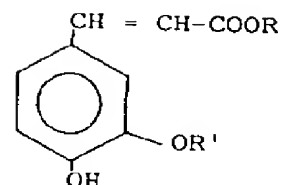
【0014】抽出は、ハイドロアルコール溶液／藻類の比率を2/1から10/1、できれば、3/1から8/1として行う。

【0015】最善の効果を引き出すには、3種類の藻類のそれぞれを少なくとも5%、できれば、10%の比率の混合物にして、ハイドロアルコール抽出を行う。

【0016】抽出後、選別析出によって精製し、それから0.22ミクロンのフィルタでエキスをろ過して、保管する。

【0017】本発明に準拠して使用する生コーヒー豆のエキスは、生コーヒー豆（アカネ科のコーヒーノキ）のエキスの精製された画分である。主要成分は、フェノール酸で、その基本的化学構造は次の通りである。

## 【化1】



【0018】生コーヒー豆のエキスは、カフェイン酸の濃度を40%より上、できれば、45%より上とし、エキスの乾燥質については50%より上であれば、さらに好ましい。

【0019】好ましい実施形態によると、本発明に準拠して使用する生コーヒー豆のエキスは、カフェイン酸が40%から85%、できれば、50%から80%で、60%から77%であれば、さらに好ましく、クロロゲン酸が1%から10%、できれば、2%から8%である。

【0020】この生コーヒー豆のエキスは、通常、麦芽デキストリン(maltodextrine)に噴霧された軽い芳香性の白色の粉末である。標準的な分析結果は、次の通りである。

カフェイン酸	: 50 - 55%
クロロゲン酸	: 2 - 5%
その他のフェノール酸	: 2 - 5%
麦芽デキストリン	: 15 - 22%
水	: 最大5%

【0021】生コーヒー豆のエキスを含有される大部分の分子の分子吸収は、321nmで20,000なので、このエキスの消衰係数は、321nmで約500となる。このように消衰係数が比較的高いので、エキスは紫外線(UV)、取分け、UVB紫外線に対する優れた保護特性を備えている。

【0022】クロレラ、セネデスムス及びスピルリナの藻類エキスと生コーヒー豆エキスとの会合から得られる相乗作用は、取分け、生コーヒー豆エキスに対する藻類エキスの重量比が1/1から30/1、できれば、2/1から20/1のとき、さらに、3/1から15/1のときには、著しく強くなる。

【0023】本発明によるアンチ・フリーラジカルの二元素会合は、皮膚や毛髪の治療、或いは抗炎症治療のための化粧品または医薬品の組成物として使用することができる。本発明は、従って、少なくともクロレラ、セネデスムス及びスピルリナなどの藻類のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆エキスの有効量を含有することを特徴とする、化粧品または医薬品の組成物を対象としている。

【0024】有効量とは、求められている保護作用ないし抗炎症作用を得ることができる量のことである。さらに具体的には、この量は、生コーヒー豆のエキスについては、重量比で0.01から8%、できれば、0.02から5%であり、0.05から5%であれば、さらに好ましく、クロレラ、セネデスム及びスピルリナなどの藻類エキスについて

は、0.1 から15%、できれば、0.2から12%、さらに、0.5から8%であれば、より好ましい。

【0025】本発明による外用薬のための組成物は、取分け、水性相内における脂肪相の分散(H/E)またはその反対の分散(E/H)から得られるローション或いは血清タイプの溶液や分散(dispersion)、或いは乳液タイプの液体または半液体コンシステンシーの乳剤、またはクリーム或いはゲル・タイプの柔らかなコンシステンシーの懸濁液または乳濁液、或いはイオン／非イオン・タイプの極微球、極微粒または小水泡状分散としてもよい。

【0026】このような組成物は、それ自体として確認することができるように調製することができ、取分け、顔、手または身体の洗浄、保護または手入れのためのクリーム、例えば、デイ・クリーム、ナイト・クリーム、クレンジング・クリーム、ファウンデーション・クリーム、日焼け止めクリーム、リキッドファウンデーション、抗炎症クリーム或いはボマード、クレンジング乳液、保護または手入れ用ボディ乳液、日焼け止め乳液、洗顔ローション、日焼け止めローション、日焼けローション、入浴用組成物、殺菌剤を含有するデオドラント用組成物、シャンプー、ヘアローション、ヘアクリームなどを構成する。このような組成物は、例えば、石鹸などの固体とすることもできる。液体組成物は、アエロゾル・スプレーとすることもできる。

【0027】本発明の好ましい実現形状によると、本発明による組成物は、クロレラ、セネデスム及びスピルリナなどの藻類のハイドロアルコール・エキスと生コーヒー豆エキスとの二元素会合の他に、重量比が0.01から6のトコフェロール、取分け、トコフェロール・リノール酸塩を含んでいる。トコフェロール・リノール酸塩は、トコフェロール脂肪酸の複数のエステル混合物である。少なくとも、51%のトコフェロール・リノール酸塩、25%のトコフェロール・オレイン酸塩、トコフェロール・パリミチン酸塩及びトコフェロール・ミリスチン酸塩を含んでいる。

【0028】トコフェロール・リノール酸塩は、アンチ・フリーラジカル因子を構成し、皮膚に不可欠な脂肪酸ーリノール酸ーをもたすが、水和因子としても作用して、紫外線の照射から生じる角質の硬化を防止する。従って、このトコフェロール・リノール酸塩は、日焼け下地用(pre-solaire)及び日焼け用薬剤への利用が特に勧められる。

【0029】本発明による二元素会合及び、場合によっては、トコフェロール・リノール酸塩の他に、本発明による組成物は、皮膚または毛髪のための化粧品または医薬品の組成物に従来の使用される活性成分または補薬を含むこともできる。

【0030】さらなる長所として、本発明による組成物は、酸化反応を引き起こす二価または三価イオンの錯化を目的として、第二ナトリウムEDTAなどの錯化剤を含ん

でいる。

【0031】ソーラー・フィルタ、できれば、EUSOLEX 6300やUVINUL MS40などの商標で市販されている非プロラジカル・フィルタは、上記の組成物に使用することができる。同様に、上記の組成物は、酸化チタン、或いはシリコンなどをコーティングされた酸化チタン、マイカチタン、或いはコーティングされたマイカチタン、マイカ、或いはコーティングされたマイカ、或いはポリメタクリル酸メチルなどの色素を含有することもできる。

10 【0032】これらの成分が通常使用される量は、ソーラー・フィルタについては重量比で0.01から5%、色素については0.1から5%、ナトリウムEDTAなどの錯化体については0.01から0.1%である。

【0033】あらゆる化粧品と同様、緩和薬、香料、保存剤、染料、乳化剤なども必要に応じて使用することができる。

【0034】本発明による化粧品の組成物は、すぐに使用することができる組成物としても良いし、使用前に希釈する濃縮溶液またはペーストとしても良い。

20 【0035】本発明は、同様に、皮膚や毛髪の治療または抗炎症治療のための化粧品または医薬品の組成物の調製のために、クロレラ、セネデスム及びスピルリナなどの藻類のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆のエキスの会合を利用することを目的としている。

【0036】本発明は、さらに、少なくともクロレラ、セネデスム及びスピルリナなどの藻類のハイドログリコール・エキスと生コーヒー豆エキスを含む組成物を皮膚や毛髪に使用することを特徴とする、化粧品による治療を目的としている。

30 【0037】本発明に準拠した化粧品による治療方法は、上述の化粧品の組成物を従来の使用方法に従って利用することにより実現することができる。この化粧品による治療方法は、本発明による会合の有効量、すなわち、求められている保護作用を得るための十分量を使用して実現する。

【0038】この化粧品による治療方法は、酸化剤、太陽光線、汚染剤などの外部から有害作用を及ぼすエレメントに対して皮膚や毛髪を保護し、皮膚や毛髪の組織を維持し、皮膚の質を改善することを目的としている。

40 【0039】本発明は、下記に実施例とともに後述する評価テストや適応例などを参照すると、さらによく理解することができる。

【0040】

【実施例】

実施例1：本発明に準拠して使用される藻類エキスのアンチラジカル・ポテンシャルの評価

1. 「試験管内の」脂質の過酸化化反応に対する保護  
リボソーム形状の3%の磷脂質の分散を所定の手続きに従って有害なラジカル作用に付す(下記を参照)。この状態で、脂質の劣化を抑制する能力により、薬剤のアンチ

ラジカル能力を評価する。この脂質の劣化は、紫外線の分光測光によって測定することができ、233nmでの最高吸収値が共役ジエンに相当する。

【0041】所定の試験手続きは、次の通りである。3%のリボゾーム溶液に0.02%のFeCl<sub>2</sub>、0.3%のKSCN及び10倍に希釈された110容量(volume)の過酸化水素を添加する。

【0042】FeCl<sub>2</sub>を添加する前のサンプルは、酸化剤を添加しないで冷所に保管し、分光測光の基準溶液として利用する。テストするサンプルは、45℃のウォータバスに6時間、さらに、外気温で一晩、放置する。保存剤を使用しないで操作する。

【0043】図1の曲線は、233nmで共役ジエンの特徴的なピークが見られ、(藻類エキスを含まない)標準サンプルがひどく酸化していることを示している。5%のスピリリナ、クロレラ、セネデスムスなどの藻類のハイドログリコール・エキスを含み、試験に付した混合物(下記に、ARLエキスを略称する)の曲線は、脂質過酸化生成の優れた抑制率を示しており、抑制率は85%より上である。

【0044】2.「生体の」アンチ・フリーラジカル保護前腕の皮膚の「生体の」アンチ・フリーラジカル能力の評価は、ARLエキスの有無を問わず、UVA光線を照射して、時間の経過につれてのβカロチンの脱色に従って行う。フリーラジカル作用は、酸化によるβカロチンの脱色を引き起こす。

【0045】エーテルで皮膚(前腕)を洗浄した後、試験する活性成分を含む薬剤(クリーム或いは乳液)の所定量(50μl)を5cm<sup>2</sup>の表面に軽くマッサージをしながら適用する。

【0046】処理した場所の皮膚の色をミノルタのクロマメータで測定する(B<sup>0</sup>値)。30分後、βカロチンを含む溶液をそれぞれの部位に適用して、再度、皮膚の色を測定する(B<sup>100</sup>値)。

【0047】それから、前腕にUVAを照射する(各照射は、2ジュール/cm<sup>2</sup>の量に相当する)。処理後、皮膚の色を測定する(B<sup>2</sup>、B<sup>4</sup>、B<sup>6</sup>、B<sup>8</sup>、B<sup>10</sup>及びB<sup>12</sup>値)。クロマメータで読み取ったこれらの値から、次の公式で色指数を算定する。

$$I = 100 - \left\{ \left( \frac{B^{100} - B^n}{B^{100} - B^0} \right) \times 100 \right\} \quad (40)$$

但し、n = 2、4、6、8、10、12。

【0048】数値を問わず、この色指数は、放射照度が増加するにつれて小さくなる。ARLの保護作用をより正確に評価するには、次の公式でアンチ・フリーラジカルの保護指数を算定する。

$$I_{\text{ARL}} = \left\{ \left( \frac{I_{\text{ex}} - I_{\text{p}}}{I_{\text{p}}} \right) \times 100 \right\}$$

但し、xは試験に付す薬剤、pは偽薬である。

【0049】試験は、27歳から42歳の5名のボランティアの被験者(男性2名、女性3名)を対象にして行われ

た。両腕を使用すれば、測定数を倍にすることができ、それぞれ3%と6%のARLを含む2種類のH/Eクリームの効力と偽薬クリームの効力とを比較する。

【0050】図2は、2つのARL濃度の異なるアンチ・フリーラジカルの保護指数I<sub>ARL</sub>を示している。効力が照射量につれて増加していることが分かる。

【0051】これらの試験は、ARLがアンチラジカル特性と保護特性を備えており、発生したフリーラジカルを捕らえて、連続的なラジカル反応をブロックすることを示している。

【0052】実施例2: ARLと超酸化物=ジスムターゼ(SOD)のアンチラジカル・ポテンシャルの比較

ARLのアンチラジカル作用は、アンチラジカル特性が優れていることで知られている薬剤、この場合には、下記にSODと略称する超酸化物=ジスムターゼ(例えば、S3589の番号でSIGMA社が商品化した薬剤)と比較して評価された。

【0053】この方法は、試験の対象となる、濃度の異なる活性成分と接触したときに、ヒポキサンチン・キシナンチン・オキシダーゼ・システム(HX-XO)によって誘発される細胞質毒性の比較評価を原則とする。HX-XO酵素システムは、酸化ラジカルの大部分を発生する。しかしながら、様々な作業から、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が主要な有害作用要因であることが明らかになった。

【0054】実験手順は次の通りである。ネズミの繊維芽細胞(L929系統株)を、ウエルが96ある小プレートに25,000細胞/ウエルの割合で播種する。播種から24時間後に、培養器を新しいものと交換する。プレートは、37℃の温度で、48時間、観察を続ける。

【0055】この温置操作後、培養器を除去する。細胞は、HX-XOシステムを利用して、フリーラジカル作用に付す。PBS+緩衝液に調製した8mU/mlのXO溶液100μlを各ウエルに添加し、さらに、濃度を高めながら100μlのHX溶液を添加する。

【0056】2時間30分の温置操作後、プレートを空にして、洗浄し、再度、培養器を入れる。それから、プレートを再度、24時間、観察する。温置操作後、細胞の生命力をMTT 3(4,5-ジメチルチアゾール-2-yl)-2,5-ジフェニル・テトラゾール臭化物を利用した試験によって評価する。この試験の原則は、新陳代謝の盛んな細胞のサクシニル・デヒドロゲナーゼ・ミトコンドリアによってMTTが不溶性の青紫色のホルマザンに還元されるという事実に基づいている。試験は、従って、MTTの添加及び3時間の温置の後、生成したホルマザンの溶解を原則とする。それから、青紫色の溶液の光学的濃度を、分光測光によって測定する。すなわち、光学的濃度は、新陳代謝の盛んな細胞数に比例することになる。

【0057】保護作用の研究には、15μg/lのヒポキサンチンの濃度を取り上げた。

【0058】研究に付した水溶性の活性成分の保護作

用：ARLとSOD

保護作用は、次のような実験手順に従って評価した。ネズミの繊維芽細胞（L929系統株）を、ウェルが96ある小プレートに25,000細胞／ウェルの割合で播種する。播種から24時間後に、培養器を除去し、研究対象の薬剤を含む培養器と交換する（「予防」処理）。

【0059】各活性成分について、DNC、1/2DNC及び1/10DNCの3種類を適用した。48時間の「処理」の後、プレートを空にして、研究対象の成分と接触させて（「即時」処理）、2時間30分の間（HX=15μg/ml及びX0=8mU/ml）、HX-X0システムの作用に付す。

【0060】2時間30分の温置の後、プレートを空にして、洗浄し、フリーラジカルの発生システムを除去する。それから、薬剤を内包する新しい培養器を細胞に入れる（「治療」処理）。

\*【0061】24時間の温置の後、「標準」培養器と「処理」培養器の細胞の生命力をMTTを使用した細胞生命力試験によって評価する。

【0062】細胞が、所定の成分で「処理」されている場合、毒性率は、次の公式で算定する。

$$A = [ \{ \text{未処理DOウエル} - (\text{未処理DOウエル} + \text{HX}) \} / \text{未処理DOウエル} ] \times 100$$

$$B = [ \text{処理DOウエル} - (\text{処理DOウエル} + \text{HX}) / \text{処理DOウエル} ] \times 100$$

10 【0063】研究対象の薬剤の保護作用率は、次の公式で判定する。

$$\text{作用率} = \{ (A - B) / A \} \times 100$$

【0064】下記の表1は、ARLとSODの結果を表す。

【0065】

\* 【表1】

	濃度	1/10	1/2	DNC	1/10	1/2	DNC
作用%		31	41	71	29	75	91
試験		NS	S	S	NS	S	S
(S:統計的に重要(p<0.05))							
試験:分散分析とDunnett試験)							

【0066】研究に付した2種類の薬剤が優れたアンチ・フリーラジカル作用を示しているのが確認できる。しかしながら、ARL薬剤の作用の方がSOD薬剤の作用よりも弱い。この2薬剤については、保護作用は摂取用量に依存している。

【0067】実施例3：生コーヒー豆エキスのアンチ・フリーラジカル・ポテンシャルの評価

この評価は、紫外線(UVB)によって標準培養器と、濃度の異なる生コーヒー豆エキス（下記に、ECVと略称する）で処理した処理培養器上に誘発される細胞質毒性を比較して行った。

【0068】UV照射の細胞質毒性

実験手順は次の通りである。ネズミの繊維芽細胞（L929系統株）を、ウェルが96ある培養小プレートに30,000細胞／ウェルの割合で播種する。播種から24時間後に、培養器を新しいものと交換する。プレートをCO<sub>2</sub>恒温器に入れて、48時間、温置する。この温置操作後、プレートを空にする。

【0069】細胞は、フェノールの赤のないHankの食塩液を使用して、UVB照射（フィリップスのTL 20 W/12チューブ）に付す。

【0070】照射の後、プレートを空にして、新しい培養器を設ける。CO<sub>2</sub>恒温器内での24時間の温置操作後、MTTを使用した比色試験によって細胞の生命力を評価する。

【0071】細胞の死亡率と照射時間にはログ(log)で表現される直線的関係がある。

$$\text{確率(死亡率)} = 1.309 \log(\text{時間}) + 4.167$$

回帰直線を利用すれば、50%の細胞の死亡率を引き起こす照射時間（TL50=4分）、或いは70%の死亡率を引き起こす照射時間（TL70=11分）を算定することができる。

※す照射時間（TL50=4分）、或いは70%の死亡率を引き起こす照射時間（TL70=11分）を算定することができる。

【0072】ECVの保護作用

実験手順は次の通りである。ネズミの繊維芽細胞（L929系統株）を、ウェルが96ある小プレートに30,000細胞／ウェルの割合で播種する。播種から24時間後に、培養器を除去して、研究対象の薬剤を含む新しい培養器と交換する（「予防」処理）。DNC、1/2DNC及び1/10DNCの3種類の濃度の ECVを研究に付す（一つの濃度ごとに8ウェルのカラム2本）。

【0073】48時間の「予防」処理の後、プレートは空にし、細胞は、フェノールの赤のないHank溶液を使用して、ECVと接触させてUVB紫外線照射に付す（「即時」処理）。

【0074】照射の後、食塩溶液を除去して、24時間、濃度の異なる活性成分を含む新しい培養器と交換する（「治療」処理）。

【0075】細胞の生命力は、試験後に、MTTによる試験で評価する。UVB によって誘発される毒性率は、照射していない「内標準」と比較して、次の公式を使用して、活性成分の各濃度について算定する。

$$\text{細胞毒性率(\%)} = \{ (\text{未照射DOウエル} - \text{照射DOウエル}) / \text{未照射DOウエル} \} \times 100$$

【0076】標準ロットと処理ロットの培養器は、2回、UVB照射した。

—t1: 2分（すなわち、93mJ/cm<sup>2</sup>）。標準ロット内の細胞の死亡率が約30%になるための必要時間（上述の回帰直線の方程式による）。

—t2: 2分（すなわち、280mJ/cm<sup>2</sup>）。未処理の培養器

## 11

の細胞の死亡率が65%になるための必要時間。

【0077】得られた結果は、下記の表2にまとめた。

【0078】

【表2】

濃度	DNC	E.C.V. 1/2DNC	1/10DNC
AP1 (93mJ/cm <sup>2</sup> )	100%	100%	40%
AP2 (280mJ/cm <sup>2</sup> )	100%	100%	14%

【0079】ECV を使用して得られる保護作用は、93mJ/cm<sup>2</sup>の照射後のDNCと1/2DNCロットについては、完璧であることが確認できる。このロットについては、細胞の死亡はまったく確認されないが、未処理の標準ロットについては、約40%の死亡率が記録されている。保護作用は、1/10DNCについても大きい。

【0080】未処理の標準ロットでは、67%の死亡率を引き起こした280mJ/cm<sup>2</sup>の照射後に、同等の結果が得られている。

【0081】従って、生コーヒー豆エキ스는重要なアンチ・フリーラジカル作用を備えていると結論付けることができる。

【0082】実施例4：複数の野菜エキ스의フリーラジカル捕獲作用の評価

この評価を行うには、フリーラジカル発生モデルとして、光照射(photoirradie)した天然フェオメラニンを使用する。天然フェオメラニンは、その組織内に固有のフリーラジカルを内在しているので、天然フェオメラニンを光酸化させると、ラジカル種の数が増加する。

【0083】検出は、直接法—フリーラジカルを証明する選り抜きの分光法である電子常磁性共鳴(R.P.E.)—によって行う。

【0084】試験をする薬剤のフリーラジカル捕獲作用は、ラジカルの発生を抑制する能力を測定して評価する。

【0085】赤毛から抽出した天然フェオメラニンを使\*

薬剤と濃度
1.薄くしたAlep Supextractの塊
2.ERL生コーヒー豆エキス
3.緑茶のドライ・エキス
4.シルマリナ・フィトソマ (Sylmarina fitosoma)
5.緑茶エキス
6.トコフェロール・リノール酸塩
7.桑の葉の濃縮物
8.スピルリナ・エキス
9.ARL
10.エパリン(Epaline)

【0093】光照射したフェオメラニンの信号の振幅の縮小は、5種類の薬剤を使用した場合について確認されたが、この縮小は、実際のところ、ERL生コーヒー豆エキス、トコフェロール・リノール酸塩及び ARL藻類エキ※50

## 12

\*用する。これはヘテロポリ化合物で、もっともよく見られる単重体は、プロテインと会合した4-ヒドロキシベンゾチアゾール単位体である。

【0086】No.1 からNo.10までの番号をふったいくつかの野菜エキスを試験に付して、アンチ・ラジカル作用を評価した。濃度は、5%を最大値として、各薬剤の水溶性に応じて選択した。脂溶性薬剤 (No.6 からNo.10までの薬剤) については、溶解度は界面活性剤Montanox®80を使用して確認した。

10 【0087】薬剤No.1は、2%と酸化性が極めて高いので、濃度は0.5%とした。測定には、PERKIN ELMER分光光度計を使用する。光分解は、ソーラー・スティミュレータを使用して行う。つまり、キセノン・アーク・ランプである。

【0088】安定したフリーラジカルの検出には、ER 200 BRUKER 分光計を使用する。200μlのフェオメラニン溶液(2mg/ml, pH:7.4)を、R.P.E.空洞共振器内の水晶製容器に入れる。ランプの光束を空洞共振器に集束する。照射は、R.P.E.装置内で行う。

20 【0089】R.P.E.スペクトルは、照射の前(内在信号)と後(発光信号)で確認する。それから、薬剤を使用する場合としない場合の、フェオメラニンの発光信号の振幅の比較を行う。フェオメラニン溶液の信号の振幅は、まず、試験の対象となる薬剤を使用しない場合、次いで、薬剤を使用した場合について、照射の前後に測定する。

【0090】薬剤を使用した場合と使用しない場合の、フェオメラニンの内在信号(A<sub>IN</sub>)と発光信号(A<sub>ILL</sub>)の平均的振幅と標準偏差を算定する。試験に付す薬剤の効果は、次の計算式で評価し、振幅変動率Vで表現する。  

$$V = \{[(A_{ILL} - A_{IN})_{薬剤} - (A_{ILL} - A_{IN})] / (A_{ILL} - A_{IN})\} \times 100$$

【0091】試験の対象となる薬剤を使用した場合の、発光信号の振幅変動率を下記の表3に示す。

【0092】

【表3】

信号の平均的振幅変動率%	
0.5%	+71.35% +/- 11.71
2%	-53.43 +/- 11.36
2%	+30.77% +/- 7.42
2%	-13.13% +/- 16.18
5%	+9.56% +/- 9.17
2%	-30.81% +/- 7.87
5%	+8.33 +/- 7.64
5%	+12.03 +/- 9.31
5%	-30.20 +/- 10.92
5%	-0.47% +/- 7.52

※50の3種類の薬剤を使用した場合でなければ有効でないことが確認される。

【0094】従って、これらの薬剤は、優れたラジカル発生抑制作用を持っていることを証明している。

13

【0095】その他の薬剤、取分け、0.5%の薬剤1と2%の薬剤3は、光照射したフェオメラニンの信号を大きくさせる。これらの薬剤は、酸化促進剤である。

【0096】実施例5：ARLとECVの濃度と相乗作用の変化にともなうラジカル作用

上述の方法と同じ方法を使用する。薬剤の濃度の変化に\*

	0.50%	1%	2%	4%	5%
ECV	-56.36 +/-4.19	-56.17 +/-6.41	-50.19 +/-13.04	-61.48 +/-12.51	-
トコフェロール ・リノール酸塩	+1.73 +/-13.44	-6.91 +/-12.16	-30.81 +/-8.80	-	-
ARL	-9.27 +/-10.14	-6.37 +/-2.59	-17.9 +/-10.84	-29.84 +/-5.79	-30.24 +/-12.21

【0098】ECV薬剤は、濃度が0.5%から4%の間で変動するときには、ラジカル発生抑制能力はほとんど同程度である。

【0099】トコフェロール・リノール酸塩のラジカル発生抑制能力は、用量によって異なる。この抑制能力は、2%以上になってからでないと大きくならない。

【0100】ARL薬剤は、用量によってラジカル発生を抑制する。この抑制力は、2%の濃度から大きくなる ※20

会合薬剤を使用した場合の発光信号の振幅の変動率

会合	平均的信号振幅変動率
0.5%のECV+2%のトコフェロール・リノール酸塩	-23.45+/-4.95
0.5%のECV+4%のARL	-58.33+/-4.37

【0102】試験に付した2種類の薬剤の会合については、ラジカル発生を抑制することを確認することができるが、同様に、ECVとARL薬剤の会合を使用した場合のフェオメラニンの発光信号の振幅の変動率は-56.33+/-4.37なので、この会合の抑制力がもっとも小さいことが分かる。

【0103】このように、0.5%のECVと4%のARLの会合は、光照射されたフェオメラニンから発生するフリーラジカルに対して優れた抑制能力を備えている。

【0104】この活性成分の会合の長所は、これらの薬剤の作用が及ぼす相乗効果であり、ARLは、そのアンチ・ラジカル特性及びアンチ・ポリユーション特性によって作用して、ヒドロキシル・ラジカルなどの強力な酸化★

\*ともなう発光信号の振幅の変動率を、ECV薬剤、トコフェロール・リノール酸塩及びARLについて下記の表4に示す。

【0097】

【表4】

※が、4%で効力は停止する。次いで、これらの薬剤の次のような2種類の混合物が試験に付された。

-0.5%のECV + 2%のトコフェロール・リノール酸塩

-0.5%のECV + 4%のARL

これらの会合による発光信号の振幅の変動率を表5に示す。

【0101】

【表5】

★剤の作用に対して外側及び内側の皮膚の細胞を保護し、生コーヒー豆エキスは、紫外線に起因する有害なラジアル作用に対して保護をする。

【0105】実施例6：デイ・クリームとナイト・クリーム

30 例証として、本発明による化粧品の幾つかの組成物を下記に紹介するが、実施例はこれに限定されるものではない。

【0106】最初の組成物はデイ・クリーム、二つ目はナイト・クリームである。それぞれの処方下記表6に示す。

【0107】

【表6】

	デイ・クリーム	0.6ナイト・クリーム
水	63.500	qsp 100.00
カプリリク・カプリク・トリグリセリド	4.000	7.00
プロピレン・グリコール	2.00	2.00
ポリエチレン・グリコールPEG 8	1.00	1.00
ミネラル・オイル	8.00	12.00
ポリグリセリル・メタアクリリクト	10.00	10.00
ポリグリセリル・ステアリン酸塩とPEG 100ステアリン酸塩	2.00	4.00
ジメチコン	3.00	3.00
フェノキシエタノール	0.400	0.40
メチルパラベン	0.300	0.300
ブチルパラベン	0.100	0.100
イソブチルパラベン	0.050	0.05
プロピルパラベン	0.100	0.1
エチルパラベン	0.050	0.05
トコフェロール・リノール酸塩	0.5%	0.5%
ARLエキス	5%	5%
ECV	1%	1%

15

16

## 実施例7：ファウンデーション

ー水	qsp	100.000
ープロピレン・グリコール		10.000
ーキサンタン・ゴム		0.300
ージメチコン		2.000
ーミネラル・オイル		5.000
ーソルビタン・ステアリン酸塩		2.00
ーPOEソルビタン・ステアリン酸塩		2.00
ーイソステアリル・ネオパンタノアト		5.00
ーカプリリク・カプリク・トリグリセリド		4.00
ータルク		2.00
ー酸化鉄色素（赤、黄土色、黒）		2.50
ー酸化チタン		8.00
ーマイカ		1.00
ーフェノキシエタノール		0.400
ーメチルパラベン		0.300
ーブチルパラベン		0.100
ーイソブチルパラベン		0.050
ープロピルパラベン		0.100
ーエチルパラベン		0.050
ートコフェロール・リノール酸塩		3%
ーARLエキス		4%
ーECV		2%

【0109】実施例8：本発明によるARLと生コーヒー豆エキスの会合は、極めて興味深いアンチ・ラジカル特性とアンチ・ポリマー化特性を示すだけでなく、下記の実施例が示すように、表6に処方方を明記したデイ・クリームを使用すると、抗炎症作用も示す。

【0110】抗炎症作用は、人間については、ニコチン酸メチルを使用した炎症モデルに基づいて、皮膚の血液量の測定によって評価した。

【0111】試験に付した薬剤は、次の通りである。

ー表6に処方方が明記されたデイ・クリーム。すなわち、このクリームは、本発明による結合を含む。

ーニフルミク酸をベースにした調合薬（商標：Nifluril<sup>R</sup>）。これは、正標準として利用する。

ー未処理のむき出しの皮膚。負標準として利用する。

【0112】試験は、事前に実験の内容について説明を受け、納得をした10名の健康なボランティアの被験者を対象にして行われた（女性9名、男性1名。平均年齢：26歳）。

【0113】皮膚の微小循環の変動は、ドップラー・レーザ速度測定法（Periflux PF2B）によって測定した。

【0114】実験手順

\* 研究部位は、前腕の内側とする。測定は、気温を22℃、相対湿度を55%にコントロールした環境内で行う。

【0115】被験者は、記録前に15分間、休憩させる。ランダム化の後、クリームと正標準を4mg/cm<sup>2</sup>の割合で使用。予備試験を行って、最適の薬理学的反応を確認するために必要な被覆時間を測定した。この時間は、3時間である。

【0116】各部位は、むき出しの標準部位を含み、3時間、被覆包帯でカバーをする。それから、被覆包帯を取り外し、部位を洗浄して、拭く。5分後、ニコチン酸メチルの5%の水溶液2mg/cm<sup>2</sup>を試験対象部位に使用して、炎症を起こさせる。それから、30分間、皮膚の血液流を記録する。

【0117】試験結果

処方が皮膚の血液流に対して及ぼす作用の生体評価の結果は、被覆されない未処理部位で測定した生理学的基線と比較して、曲線の下部分(ASC)の計算によって表現する。

【0118】結果は、下記の表7にまとめた。

【0119】

【表7】

\*

17 被験者	曲線の下部分のデータの結果 むき出しの皮膚	Nifluril <sup>®</sup> (登録商標)	本発明のデイ・クリーム	18 基線
1	1229	50	191.3	35
2	502.2	74.5	132.5	54
3	647	593	529.3	27
4	285.8	53.6	81.2	16.2
5	463.5	42.9	55.6	27
6	423	113.1	108.3	16.2
7	675	63.3	110.4	24.3
8	395.7	85.4	225.5	26.5
9	11.7	86.8	29.8	24.3
10	654.3	75.7	52.8	22.7
平均値	539.26	123.83	151.64	27.32

【0120】炎症の抑制率は、下記の公式を使用して、本発明による活性成分の会合を含むデイ・クリームとNifluril（登録商標）について算定した。

抑制率(%) = {むき出しの皮膚(曲線下部) - 薬剤(曲線下部)} / むき出しの皮膚(曲線下部)

Nifluril（登録商標）について確認された抑制率は、81.26%である。本発明によるクリームについて確認された抑制率は、75.84%である。

【0121】従って、本発明による手入れクリームは、ニコチン酸メチルによって引き起こされた炎症を著しく抑制している。

【0122】この抑制力は、Nifluril（登録商標）抗炎症クリームの抑制力とほとんど同じであり、めざましい\*

\* 成果である。

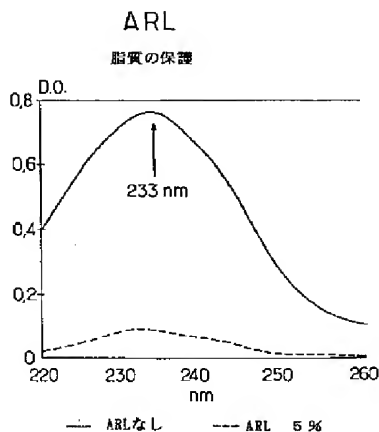
【0123】すなわち、本発明による活性成分の会合は、アンチ・ラジカル特性とアンチ・ポリューション特性だけでなく、ニコチン酸メチルによって引き起こされる炎症に対しても極めて有効で、利用価値の高い作用を備えており、炎症反応に対して重要な抑制力を発揮する。

【図面の簡単な説明】

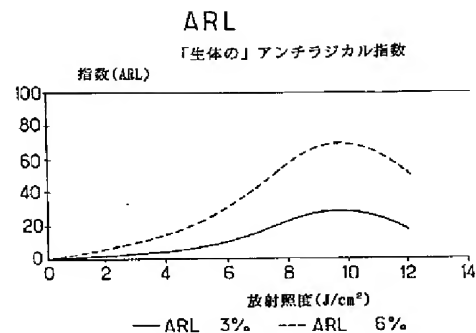
【図1】 ARLなしと ARL5%における脂質の保護性を示す。

【図2】 2つのARL濃度の異なるアンチ・フリーラジカルの保護指数I ARLを示している。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 7/06

7/48

31/19

31/215

31/355

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

9454-4C

9454-4C

9454-4C

( 1 1 )

特開平7-145067

31/52  
35/78  
//(A 6 1 K 35/80  
35:78)  
(A 6 1 K 31/52  
31:355)

9454-4C  
C 8217-4C